

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 326 934

(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

A1

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 76 30396

(54) Nouvelle composition pharmaceutique à base de sphérules de sérum-albumine renfermant un médicament.

(51) Classification internationale (Int. Cl.²). A 61 K 47/00.

(22) Date de dépôt 8 octobre 1976, à 16 h 24 .n.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée aux Etats-Unis d'Amérique le 9 octobre 1975, n. 621.145 au nom de Anthony F. Yapel Jr.*

(41) Date de la mise à la disposition du public de la demande B.O.P.I. — «Listes» n. 18 du 6-5-1977.

(71) Déposant : Société dite : MINNESOTA MINING AND MANUFACTURING COMPANY, résidant aux Etats-Unis d'Amérique.

(72) Invention de :

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Simonnot, Rinuy, Santarelli.

La présente invention concerne dans son ensemble le domaine de la formulation des médicaments. Elle a trait en particulier à la formulation de médicaments dans un support inerte pouvant être mis en suspension dans un liquide sous une forme qui convient pour l'injection parentérale dans l'organisme. L'invention a trait notamment à l'emprisonnement de médicaments dans un support poreux qui permet une libération limitée de chaque médicament à la suite de son introduction dans l'organisme.

La science médicale a reconnu depuis longtemps la nécessité de trouver un moyen efficace pour limiter la libération de médicaments dans l'organisme, de manière qu'un médicament puisse être administré moins fréquemment tout en restant à des taux thérapeutiques continus dans le sang en circulation d'un patient.

Les tentatives de limitation de la libération d'un médicament ont eu un certain succès lorsque le médicament a été administré par voie orale. Divers enrobages et divers encapsulages ont été étudiés pour envelopper le médicament et retarder sa libération.

La libération réglée des médicaments administrés par voie parentérale, notamment par voie intravasculaire, a présenté des problèmes importants.

Ordinairement, l'injection intravasculaire requiert le calcul précis des doses de médicament. Du fait que le médicament est immédiatement disponible pour l'organisme après son injection intravasculaire, des doses excessives de médicaments toxiques peuvent provoquer des complications graves. La voie intravasculaire a aussi été limitée à l'administration de médicaments solubles à cause du danger d'embolie que présente l'injection de particules insolubles. On manque souvent de formulations de médicaments à libération lente pour l'administration intravasculaire.

Le brevet britannique N° 931 532 décrit un procédé de micro-encapsulage de médicaments dans un colloïde hydrophile gélifiable par un processus de coacervation complexe. Le colloïde forme une membrane autour du noyau de médicament. L'hypothèse est émise que la perméabilité de la membrane peut être calculée

de manière à permettre une libération progressive du médicament.

Le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 541 201 décrit une substance injectable qui permet d'incorporer un médicament actif à la structure interne d'un support métabolisable "analogue à une protéine". Les particules de support sont injectées sous la forme d'une suspension dans un véhicule non aqueux convenable. La particule métabolisable de support est soumise à l'action des enzymes des liquides corporels et les médicaments incorporés subissent, de ce fait, une libération lente.

Les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 773 919 et N° 3 887 699 décrivent des formulations de polylactide et de médicament qui peuvent être administrées par voie parentérale et qui permettent une libération lente et soutenue du médicament pendant une certaine période.

Un problème dominant inhérent aux formulations injectables de médicaments à libération lente de l'art antérieur est que la vitesse de libération du médicament ne correspond souvent pas aux besoins du patient. Il est bien connu dans le domaine médical que pour qu'un médicament produise un effet thérapeutique maximal, il doit atteindre une concentration optimale dans le sang en circulation du patient. Ainsi, les médecins administrent souvent une dose initiale élevée ou "dose massive" du médicament pour que cette concentration soit atteinte dans le sang en circulation. Après la dose massive, des doses subséquentes sont administrées pour maintenir ce niveau. Le temps écoulé entre les doses est déterminé par la vitesse de métabolisme du médicament.

Ainsi, la formulation idéale de médicament à libération soutenue doit permettre une libération du médicament en deux étapes. Une phase initiale de libération rapide est désirable pour introduire les concentrations thérapeutiques dans le sang en circulation et une phase subséquent à libération lente est nécessaire pour maintenir les taux sanguins de médicament et pour aller de pair avec le métabolisme du médicament dans l'organisme.

Les formulations pharmaceutiques injectables connues n'offrent généralement pas un tel système de libération à deux phases. Au contraire, les vitesses de libération n'ont qu'une

phase, le médicament étant libéré graduellement et à vitesse constante pendant une période donnée.

Le support de médicament à base d'albumine de la présente invention résout efficacement ce problème de l'art antérieur et constitue un système remarquable de libération d'un médicament à deux phases. Le système de l'invention offre une libération initiale rapide et réglable du médicament emprisonné dans son support, suivie d'une phase de libération secondaire lente, réglable.

L'utilisation d'albumine comme support ou comme agent complexant pour des médicaments est connue au moins depuis 1899. Plus récemment, des sphérules de sérum-albumine ont été utilisées comme supports pour des agents diagnostiques et thérapeutiques radioactifs. Ces sphérules sont décrites dans les brevets des Etats-Unis d'Amérique N° 3 663 685, N° 3 663 686 et N° 3 663 687. Toutefois, ces brevets ne mentionnent pas que les sphérules en question aient l'aptitude remarquable de libérer les médicaments emprisonnés dans leurs supports selon un processus à deux phases lorsqu'ils sont réticulés à des températures de 110 à 180°C pendant au moins 20 minutes ou réticulés de manière équivalente par des moyens chimiques.

La présente invention concerne une composition thérapeutique permettant de limiter la libération de médicaments, comprenant des sphérules solides de sérum-albumine dans lesquelles est emprisonnée de façon homogène une proportion de 2 à 70 % en poids des sphérules d'un médicament organique non radioactif dont la solubilité dans l'eau à 37°C est au moins égale à 0,01 %. Les sphérules doivent être soumises pendant leur préparation à des températures comprises entre 110 et 180°C pendant une période minimale de 20 minutes pour réticuler l'albumine, ou à une réticulation équivalente au moyen d'agents chimiques appropriés.

Comme on le démontrera dans ce qui suit, le degré de réticulation thermique ou chimique des sphérules est important pour l'obtention de la libération à deux phases du médicament emprisonné.

Outre la libération avantageuse à deux phases du

médicament par le support à base d'albumine de la présente invention, ce système de support présente plusieurs autres particularités importantes. Le diamètre des sphérules peut être soigneusement réglé pendant le traitement et ce paramètre peut être utilisé
5 pour diriger les sphérules vers une partie donnée de l'organisme. Par exemple, des sphérules de 10 à 100 microns de diamètre se déposent facilement dans la couche de vaisseaux capillaires du poumon après une injection intraveineuse. Ainsi, des sphérules chargées de médicament dont le diamètre est de cet ordre de gran-
10 deur peuvent être utilisées avantageusement pour traiter des troubles du poumon, par exemple l'asthme, la tuberculose, la pneumonie, des tumeurs, etc.

De même, des sphérules de diamètre compris entre 1 et 5 microns peuvent être utilisées pour délivrer des médica-
15 ments au foie. Une injection intra-artérielle ou au moyen d'une sonde peut être utilisée pour diriger les sphérules vers les systèmes capillaires d'autres organes ou vers des tumeurs.

La localisation du médicament dans les vaisseaux capillaires de l'organe ou de la tumeur à traiter offre des avantages
20 évidents. Le médicament est libéré directement sur le site désiré et les effets secondaires toxiques envers d'autres tissus sont susceptibles d'être limités. Cette particularité rend le système de l'invention très intéressant à utiliser dans le traitement de tumeurs avec des médicaments anti-néoplastiques qui sont généra-
25 lement très toxiques pour l'organisme de même que pour le tissu atteint par la tumeur.

Toutefois, ce système de libération d'un médicament n'est pas limité au traitement de tumeurs ou d'organes malades. Par exemple, le poumon ou le foie sain peut être utilisé comme
30 un réservoir commode à atteindre pour la sphérule de laquelle un médicament approprié peut être réparti par voie endothérapique dans l'organisme pendant une période prolongée.

Un avantage particulièrement important de ce système de distribution réside dans l'absence de tout phénomène d'embolie
35 lorsque les sphérules de support à base d'albumine sont administrées par voie intravasculaire. Des médicaments insolubles dans l'eau

qui, autrefois, ne pouvaient pas être administrés de cette manière à cause du risque d'embolie, peuvent être administrés avec sûreté lorsqu'ils sont emprisonnés dans les sphérules d'albumine.

D'autres avantages des sphérules d'albumine en tant que supports de médicaments conformes à la présente invention comprennent leur mode de préparation, leur disparition complète dans l'organisme par métabolisme, leur non-antigénicité, leur sûreté reconnue pour l'administration intravasculaire, leur aptitude à recevoir une grande variété de molécules de médicaments d'une manière relativement non spécifique, ainsi que d'autres avantages qui apparaîtront dans ce qui suit.

La matière de support utilisée dans le système de la présente invention est la sérum-albumine. Lorsqu'on traite des patients humains, on utilise de la sérum-albumine humaine et lorsqu'on traite d'autres animaux, la sérum-albumine que l'on choisit doit être de même propre à l'espèce ; par exemple, on utilise la sérum-albumine de bœuf pour traiter des bovins. Une sérum-albumine propre à l'espèce est nécessaire pour des raisons de compatibilité.

Le terme "médicament" utilisé dans le présent mémoire désigne, au sens large, des molécules organiques non radioactives utilisées en médecine pour traiter des maladies ou des troubles de l'organisme.

L'hydrosolubilité du médicament est, dans de larges limites, très peu importante pour la mise en pratique de l'invention. Toutefois, si le médicament est très insoluble dans l'eau, c'est-à-dire si sa solubilité à 37°C est inférieure à 0,01%, il est libéré très lentement de la sphérule d'albumine et les propriétés de libération à deux phases de la sphérule sont moins manifestes.

La concentration du médicament dans la sphérule peut varier entre de larges limites. Des charges de médicament atteignant 90 % ont été atteintes avec certains médicaments. Toutefois, la concentration courante de médicament dans la sphérule va de 2 à 70 % en poids de cette dernière. On donne ci-après une énumération de quelques-unes des nombreuses classes de médicament avec

des exemples représentatifs de composés de chacune de ces classes qui ont été incorporés dans des sphérules de sérum-albumine conformément à la présente invention.

<u>Classe de médicament</u>	<u>Exemples</u>
5 Anti-asthmatiques Bronchodilatateurs	Intal (cromoglycate disodique) Epinéphrine Isoprotérénol Salbutamol Terbutaline Ephédrine Aminophylline
10 Analgésiques	Morphine Codéine Salicylate de sodium, acide salicylique, chlorhydrate de mépéridine (marque déposée "Demerol")
15 Anti-tussifs	Codéine Chlorhydrate de chlrophédianol
20 Narcotiques	Morphine Codéine Cocaïne Chlorhydrate de mépéridine (marque déposée "Demerol")
Agents mucolytiques	Acétylcystéine
25 Agents antibactériens	Sulfanilamide Sulfadiazine Tétracycline
Agents anti-tuberculeux	Rifampine (rifamycine) Dihydrostreptomycine Acide p-aminosalicylique
30 Agents hypoglycémiques	Tolbutamide (marque déposée "Orinase") Insuline
Stéroïdes	Hydrocortisone Prednisone Prednisolone Métrasulfobenzoate de prednisolone
35 Agents anti-tumoraux	Chlorambucile Busulfane
40 <u>Alcaloïdes</u> Colchicine	<u>Antimétabolites</u> 6-mercaptopurine Thioguanine 5-fluoruracile Hydroxyurée "Adriamycine" (marque déposée) Méthionine
45 Aminoacides	

La vitesse à laquelle le médicament est libéré de la sphérule d'albumine dépend dans une large mesure du degré auquel l'albumine est réticulée pendant la préparation. Comme on l'indiquera en détail dans ce qui suit, l'albumine peut être
5 réticulée par traitement thermique ou par des agents chimiques de réticulation.

Outre le degré de réticulation de l'albumine, divers autres facteurs influent sur la vitesse de libération d'un médicament particulier. Ces facteurs comprennent le poids moléculaire du médicament, sa solubilité dans l'eau et toutes interactions électrostatiques ou hydrophobes entre le médicament et l'albumine.
10

La concentration de la solution d'albumine utilisée pour préparer des sphérules exerce également un certain effet sur les caractéristiques finales de libération du médicament. Par exemple, on prépare des sphérules à partir d'une solution à 20-50 % en poids/volume de l'albumine dans l'eau. Des sphérules ont été préparées à partir de solutions dont la concentration en protéine s'abaisse à 2-5 % ou s'élève à 70-80 %. En général,
20 notamment pour des sphérules réticulées à la chaleur, les sphérules préparées à partir des solutions à concentration élevée sont plus denses et libèrent les médicaments incorporés un peu plus lentement que ne le font les sphérules préparées à partir des solutions à concentration plus faible, toutes proportions
25 gardées.

En général, un poids donné de sphères microscopiques très petites (par exemple 1 à 5 microns) contenant une quantité spécifique d'un médicament libère ce médicament plus rapidement que ne le fait le même poids de sphères microscopiques plus
30 grandes (par exemple 50 à 100 microns) contenant la même quantité de médicament, à cause de la bien plus grande surface spécifique des sphères plus petites. Par conséquent, toutes proportions gardées, des sphères microscopiques de petit diamètre libèrent en général un médicament plus rapidement que ne le font des sphères
35 microscopiques de plus grand diamètre, si l'on se base strictement sur des considérations de surface spécifique. Les variations

des diamètres des sphères peuvent donc être utilisées ainsi que les autres paramètres indiqués ci-dessus pour faciliter la régulation des vitesses de libération des médicaments des sphérules d'albumine.

5 Bien que les facteurs indiqués ci-dessus affectent les vitesses de libération de médicaments individuels des sphères microscopiques d'albumine, les propriétés de l'albumine elle-même lorsqu'elle est réticulée au degré indiqué ont pour effet que le médicament est libéré de façon inattendue selon un processus
10 à deux phases.

Le procédé de préparation des sphérules de l'invention est essentiellement celui qui a été décrit dans le brevet des Etats-Unis d'Amérique N° 3 663 667 pour la préparation de précurseurs consistant en sphérules d'albumine, mais plusieurs
15 perfectionnements ont été apportés à ce procédé.

Dans le procédé de préparation, le médicament choisi est dissous ou dispersé directement dans une solution aqueuse de la sérum-albumine à une concentration quelconque désirée. Les concentrations en albumine dans le support sont généralement
20 comprises entre 20 et 60 % en poids/volume. Les concentrations en médicament dans la solution d'albumine sont habituellement comprises entre 5 et 30 % en poids de l'albumine. Pour assurer une distribution homogène uniforme dans la solution d'albumine de médicaments très insolubles dans l'eau, ces médicaments
25 doivent être traités au broyeur à billes ou pulvérisés en très fines particules avant leur dispersion dans la solution.

Après l'addition du médicament à la solution d'albumine, on laisse le mélange s'équilibrer pendant une période de 15 à 60 minutes. Pendant cette étape d'équilibrage, un
30 certain pourcentage des molécules de médicament peut se fixer à des sites présentés par les molécules d'albumine. La quantité réelle de médicament qui est fixée dépend de facteurs tels que la nature des sites de liaison sur l'albumine, la quantité et la polarité de la charge électrostatique agissant éventuellement
35 sur le support et le médicament, la concentration du médicament et du support dans la solution en cours d'équilibrage, la cons-

tante d'équilibre entre les sites du support et les molécules de médicament, la température ainsi que d'autres considérations touchant à la loi d'action de masse.

Pour préparer des sphérules par la technique d'em-
5 prisonnement, on injecte la solution aqueuse d'albumine contenant le médicament dissous ou dispersé, à l'aide d'une aiguille hypodermique N° 20 ou 25, dans un bain d'huile végétale énergiquement agité à la vitesse de 500 à 2500 tr/min. Au cours de l'agi-
tation, on chauffe ordinairement le bain d'huile à 110-180°C
10 pendant 15 à 30 minutes puis on le maintient à cette température pendant au moins 20 minutes. Des traitements thermiques dépassant 10 heures ne sont généralement pas requis. Pendant ce processus de chauffage, qui entraîne une réticulation interne et une insolubilisation finale des sphères de support, la portion du médica-
15 ment insoluble ou du médicament soluble en excès qui n'est pas liée chimiquement à des sites réels présentés par le support protéinique est emprisonnée ou incorporée dans les interstices entre les chaînes de support formant la structure tridimensionnelle des sphérules. Ce procédé de "chauffage sous
20 agitation", mis en oeuvre dans les conditions indiquées ci-dessus, donne des sphérules insolubles dans l'eau de diamètre compris entre 5 et 80 microns. Le diamètre des particules sphériques peut être réglé par variation de la vitesse d'injection de la solution ou dispersion de support portant le médicament dans le bain d'huile
25 et/ou en jouant sur la vitesse d'agitation de ce bain d'huile. L'addition de petites quantités (0,1 à 2 %) d'un agent tensio-actif (par exemple "Tween 80", "Pluronic F-68", marques déposées) aux solutions d'albumine de départ influe également sur le diamètre final des sphérules par les effets indirects que cet agent
30 exerce sur les tensions superficielles et interfaciales. L'aptitude à la biodégradation et la porosité des sphérules peuvent être réglées en faisant varier la durée et la température de l'opération de chauffage dans l'huile. Les autres conditions restant les mêmes des températures élevées et de longues périodes de chauffage produisent généralement des sphérules plus dures, moins poreuses
35 et plus lentement dégradables. Lorsque le degré désiré d'insolubi-

lisation des sphérules a été obtenu, le bain d'huile est refroidi à l'air ou à l'eau glacée et les sphérules sont enlevées de l'huile par ultrafiltration ou par succion sur un filtre "Millipore" à pores de diamètre égal à 0,45 micron ou sur un papier-filtre "Whatman" N° 5. Plusieurs lavages subséquents des sphérules à l'heptane et/ou à l'éther éliminent toute l'huile restant à leur surface. Après séchage à l'air, les sphérules contenant le médicament sont obtenues sous la forme d'une poudre s'écoulant librement, dont la couleur varie conformément à celle du ou des médicaments incorporés. Pour l'injection intravasculaire, les sphérules sont mises en suspension dans un diluant acceptable du point de vue pharmaceutique, qui convient pour l'injection intravasculaire.

La technique d'insolubilisation à la chaleur décrite ci-dessus est particulièrement avantageuse en ce qu'elle permet d'incorporer des dispersions de médicaments insolubles dans l'eau ainsi que des solutions de médicaments hydrosolubles, par emprisonnement. Malgré ses nombreux avantages, le procédé d'insolubilisation à la chaleur présente un inconvénient, lié au fait que pendant la formation des sphérules et l'emprisonnement du médicament, les sphérules doivent souvent être chauffées à des températures de plus de 110°C. Bien que des températures élevées puissent ne pas avoir de grandes conséquences dans le cas de médicaments très stables, elles peuvent conduire à une dégradation et à une baisse de l'efficacité des médicaments, lorsque ces derniers sont peu stables. Pour pallier cet inconvénient, on a mis au point des techniques d'insolubilisation à la température ambiante.

Ces techniques d'insolubilisation à la température ambiante impliquent l'utilisation d'agents chimiques de réticulation, notamment du formaldéhyde et du glutaraldéhyde qui sont d'excellents agents de durcissement de l'albumine.

On a trouvé que des alcools absorbants lipophiles tels que le n-butanol, le sec.-butanol et le 2-éthylhexanol peuvent être aisément dissous dans une huile végétale telle que l'huile de graine de cotonnier, qui constitue un bain classique de formation de sphérules. Des agents hydrosolubles de réticula-

- tion tels que le formaldéhyde et le glutaraldéhyde peuvent être dissous dans les alcools absorbants. En particulier, on peut dissoudre jusqu'à 25 % en volume des agents réticulants hydrosolubles tels que le glutaraldéhyde (sous la forme d'une solution aqueuse à 25 %) ou le formaldéhyde (sous la forme d'une solution aqueuse à 37 %) dans un alcool absorbant lipophile tel que le n-butanol. Si l'on mélange environ 1 à 40 parties en volume de cette solution butanolique de glutaraldéhyde ou de formaldéhyde avec 70 à 500 parties d'huile de graine de cotonnier, on réalise un
- 10 bain consistant en une solution qui contient l'agent de réticulation et l'alcool absorbant, tous deux dissous. Si l'on injecte à présent une solution aqueuse de 25 à 50 % de sérum-albumine dans ce bain, tout en l'agitant à environ 1200-1500 tr/min, on produit des sphérules de diamètre compris entre 20 et 100 microns. (On
- 15 peut obtenir des sphérules de plus petit diamètre en utilisant de plus grandes vitesses d'agitation ou en réduisant la concentration du support dans la solution initiale injectée dans le bain). L'eau de dissolution contenue dans les sphérules se répartit dans l'alcool qui l'absorbe, tandis que les sphérules elles-
- 20 mêmes sont réticulées par le glutaraldéhyde ou le formaldéhyde. Les sphérules sont séparées par filtration du bain de préparation après une période d'au moins 20 minutes de contact avec le milieu de réticulation, et les caractéristiques de libération du médicament des sphérules sont semblables à celles que l'on obtient
- 25 par insolubilisation à chaud. Le degré de réticulation des sphérules peut être réglé en faisant varier la durée de contact de ces sphérules avec l'agent de réticulation et en jouant sur la quantité d'agent de réticulation contenue dans le bain de préparation.
- 30 Le procédé décrit ci-dessus est particulièrement avantageux en ce que la formation de sphérules du support, l'élimination de l'eau et la réticulation peuvent être effectuées en une seule étape pratique. Si l'agent de réticulation est omis dans le procédé décrit ci-dessus, on obtient des sphères microscopi-
- 35 ques d'albumine chimiquement débarrassées de l'eau, sèches et s'écoulant librement, qui se dissolvent au contact de l'eau.

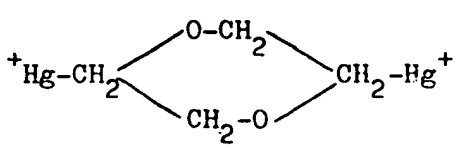
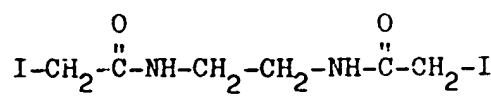
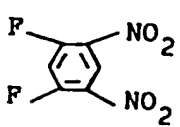
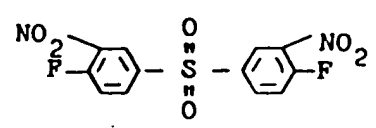
Le procédé de préparation à la température ambiante est particulièrement avantageux à utiliser pour emprisonner des médicaments solubles ou insolubles dans l'eau et sensibles à la chaleur, bien qu'on puisse l'utiliser aussi pour des médicaments stables à la chaleur. Une version modifiée de cette technique peut aussi être utilisée pour des médicaments qui peuvent être chauffés sans danger à des températures atteignant 105°C.

Conformément à cette variante du procédé chimique de réticulation, le mélange d'albumine et de médicament est injecté dans un bain à basse température (moins de 105°C) et les sphérules sont insolubilisées partiellement. A titre de variante, le mélange d'albumine et de médicament peut être transformé en sphérules et débarrassé chimiquement de l'eau sans réticulation, comme décrit ci-dessus. Les sphérules résultantes sont isolées et placées dans un dessiccateur puis exposées à l'action de vapeurs de glutaraldéhyde ou de formaldéhyde pendant une période minimale de 20 minutes. Le formaldéhyde et/ou le glutaraldéhyde peuvent être placés au fond du dessiccateur sous la forme de solutions aqueuses respectives à 37 et à 25 % du commerce. Des traitements à la vapeur d'aldéhyde peuvent être poursuivis pendant des périodes atteignant plusieurs jours, une exposition continue donnant des sphères plus denses, moins poreuses et plus insolubles dans l'eau. Après réticulation à la vapeur, le formaldéhyde ou le glutaraldéhyde en excès peuvent être éliminés des sphères microscopiques traitées, par une opération d'aspiration ou de dessiccation sous vide.

Outre le formaldéhyde et le glutaraldéhyde qui constituent les agents préférés de réticulation, on peut en utiliser d'autres dans la préparation des sphérules d'albumine de l'invention. Par exemple, on peut utiliser des cations métalliques divalents, trivalents et tétravalents. Des cations tels que Fe^{3+} , Al^{3+} , etc., sont faciles à dissoudre dans le n-butanol, le sec.-butanol, le 2-éthylhexanol ainsi que d'autres alcools déshydratants lipophiles qui, à leur tour, peuvent être dissous dans de l'huile de graine de cotonnier ou d'autres huiles végétales. La solution qui en résulte constitue un bain de réticulation

directe pour des sphérules de support à base d'albumine.

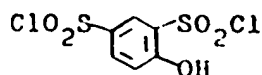
D'autres protéines de réticulation sont connues dans la pratique et peuvent être utilisées comme variantes avantageuses. Certaines d'entre elles sont énumérées sur le tableau qui suit :

5	Agent de réticulation	Solubilité	Réagit principalement avec les groupes suivants de la protéine
	3,6-bis(mercuriméthyl)-dioxanne	Soluble	Sulfhydryle
10	 <p>N,N'-(1,3-phénylène)-bismaléimide</p>	Insoluble	Sulfhydryle
15	 <p>N,N'-éthylène-bis-(iodacétamide)</p>	Soluble	Sulfhydryle
20	 <p>1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzène</p>	Insoluble	Groupes amino, tyrosine
	 <p>p,p'-difluoro-m,m'-dinitrodiphényl-sulfone</p>	Insoluble	Groupes amino, groupes phénol

Groupes amino



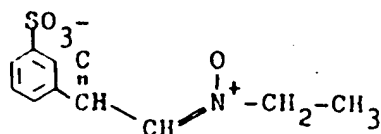
Groupes amino



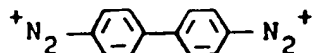
Groupes amino



Lie les groupes carbo-
xyle et amino



Tyrosine, histidine



Les réactifs insolubles dans l'eau énumérés ci-dessus
15 peuvent être dissous directement dans le bain d'huile hydrophobe
sous agitation et leur solution peut être utilisée pour réticuler
les sphérules d'albumine formées après l'injection d'une solution
aqueuse de l'albumine dans le bain. Des agents hydrosolubles de
réticulation peuvent être incorporés directement à la solution

aqueuse d'albumine ou solubilisés dans l'alcool qui se comporte comme un agent déshydratant lorsqu'il est contenu dans l'huile.

Evidemment, on peut combiner des techniques de réticulation à la chaleur et par des agents chimiques pour obtenir
5 les nouvelles sphérules à base d'albumine ayant les propriétés désirées de libération des médicaments.

Exemple 1

Cet exemple illustre des préparations caractéristiques de microsphérules d'albumine contenant un médicament, obtenues par réticulation à la chaleur et par réticulation chimique.
10

Echantillon A - Réticulation à la chaleur

On dissout 0,9999 g de sérum-albumine humaine (Sigma, Fraction V, Lot N° 246-16318) dans 2,0 ml d'eau désionisée, en agitant au moyen d'un agitateur magnétique. On ajoute
15 à la solution d'albumine 0,1057 g du médicament anti-tumoral appelé 5-fluoruracile (5-FU) (Sigma, Lot N° 23C-2850) et on continue d'agiter pendant 15 minutes. Attendu que le 5-FU ne se dissout pas complètement dans la solution d'albumine, on place le mélange aqueux dans un broyeur classique à tissu de 10 ml de
20 capacité (Ace Glass Co.) et on continue de le disperser pour assurer la distribution homogène des particules de 5-FU non dissoutes restantes dans toute la solution d'albumine.

Le mélange est immédiatement injecté à l'aide d'une seringue à tuberculine équipée d'une aiguille hypodermique de
25 0,51 mm dans 500 ml d'huile de graine de cotonnier (contenue dans un bēcher en acier inoxydable de 600 ml) à la température ambiante, en agitant au moyen d'un agitateur du type à hélice de 38,1 mm, tournant à une vitesse d'environ 2300 tr/min. Les vitesses d'agitation sont mesurées à l'aide d'un tachymètre
30 "Cole-Parmer", la vitesse d'agitation déterminant à un haut degré la distribution finale des diamètres de particules des sphères résultantes. On continue d'agiter en élevant la température du bain d'huile au moyen d'un appareil de chauffage à immersion de 500 watts jusqu'à 140°C, en une période de 15 minutes. On maintient
35 le bain à cette température pendant 1 heure tout en maintenant la vitesse d'agitation à 2300 tr/min.

A la fin de cette période, on laisse le bain d'huile et son contenu revenir à la température ambiante et on utilise un papier-filtre "Whatman" N° 5 pour séparer les sphères microscopiques résultantes de l'huile, par filtration sous vide. Les
5 dernières traces d'huile sont éliminées des sphérules contenant le médicament par plusieurs lavages avec à chaque fois 300 ml d'heptane.

Le mode opératoire décrit ci-dessus donne des sphères microscopiques de sérum albumine humaine (HSA) contenant l'agent
10 anti-tumoral (5-fluoruracile) à une concentration de 9,6 % en poids/poids. Les sphérules sont sous la forme d'une poudre non agglomérée, s'écoulant librement, de couleur brun clair, les diamètres des sphères microscopiques individuelles étant compris entre 10 et 60 microns.

15 Echantillon B - Réticulation chimique

On dissout 0,9990 g de sérum-albumine humaine (Sigma Chemical Company) dans 2,0 ml d'eau désionisé, en agitant au moyen d'un agitateur magnétique. On ajoute à l'albumine dissoute 0,1500 g de L-épinéphrine (base libre, "Sigma") et
20 0,0725 g d'acide L(+)ascorbique ("Sigma") et on continue d'agiter pendant encore 15 minutes.

Le mélange est injecté immédiatement après à l'aide d'une seringue à tuberculine équipée d'une aiguille hypodermique de 0,51 mm dans un bain de formation de sphérules consistant en
25 500 ml d'huile de graine de cotonnier, 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 %. Le bain est contenu dans un bécher en acier inoxydable de 500 ml et il est agité à la température ambiante à l'aide de l'agitateur du type à hélice de 38,1 mm à une vitesse d'environ 1200 tr/min. On mesure les vitesses
30 d'agitation à l'aide d'un tachymètre Cole-Parmer. On continue d'agiter pendant 4 heures, période pendant laquelle les sphères microscopiques formées par injection de la solution d'alumine, d'épinéphrine et d'acide ascorbique dans le bain sont débarrassées de l'eau par le n-butanol et réticulées par le glutaral-
35 déhyde présent dans le bain.

Après cette période, les sphérules microscopiques résul-

tantes sont séparées de l'huile sur du papier-filtre "Whatman" N° 5, par filtration sous vide. Les dernières traces d'huile sont éliminées des sphères contenant le médicament par lavage de ces sphères trois fois avec 100 ml d'heptane à chaque fois.

- 5 Le mode opératoire décrit ci-dessus donne des sphères microscopiques de sérum-albumine humaine contenant un médicament, de composition suivante : sérum-albumine humaine = 81,8 % ; 1-épinéphrine = 12,3 % ; acide L(+) ascorbique = 5,9 %.
- Les sphérules se présentent sous la forme d'une poudre non
- 10 agglomérée, s'écoulant librement, de couleur orangé-jaune, les diamètres des sphérules microscopiques individuelles étant compris entre 10 et 80 microns.

Exemple 2

- Dans cet exemple et dans les exemples suivants, des études
- 15 de libération in vitro portant sur des sphérules d'albumine contenant un médicament ont été conduites selon une méthode dynamique impliquant l'utilisation d'une cellule d'écoulement. La cellule d'écoulement consiste en un tube cylindrique de 12,7 mm x 50,8 mm contenant un disque de verre fritté "Corning"
- 20 Type D, (diamètre des pores de 10 à 20 microns) à chaque extrémité. Un dispositif de fermeture à pince et à joint torique permet de charger aisément les sphères microscopiques dans la cellule et de démonter facilement cette dernière à des fins de nettoyage. Dans une expérience caractéristique de libération,
- 25 on place environ 10 mg de sphérules chargées de médicament dans une partie de la cellule démontée, qu'on monte ensuite. Une extrémité de la cellule est reliée par un tube de "Teflon" (3,175 mm de diamètre extérieur ; 2,159 mm de diamètre intérieur) à une pompe doseuse "ISCO" modèle 310 que l'on utilise
- 30 pour injecter une solution saline tamponnée au phosphate (pH 7,4) (137 mM de NaCl, 27 mM de KCl, 8 mM de NaHPO_4 , 1 mM de KH_2PO_4) dans la cellule à une vitesse constante prédéterminée de pompage, généralement 30 ml par heure. L'effluent qui contient le médicament passe à sa sortie de la cellule par une cu-
- 35 vette contenue dans un groupe optique à lumière ultraviolette (ou à lumière visible selon les caractéristiques d'absorption spectrophotométrique du médicament) solidaire de l'analyseur

"ISCO" UA-2. Cet instrument représente par un graphique la variation de la concentration en médicament libérée des sphères (exprimée par la densité optique) en fonction du temps. La cellule d'écoulement reste toujours immergée dans un bain-marie
5 maintenu à 37°C.

Tout l'effluent de chaque expérience de libération d'un médicament est recueilli dans une éprouvette graduée. L'analyse spectrophotométrique de cet effluent sur un spectrophotomètre "Beckman" DK-2A conformément à la loi de Beer permet de déter-
10 miner le pourcentage total de médicament libéré par les sphères microscopiques au cours de l'expérience de libération. Une méthode de découpage et de pesée de l'aire délimitée sous la courbe de libération du médicament donnée par le graphique permet de déterminer le pourcentage de médicament libéré par
15 les sphères microscopiques en fonction du temps.

Cet exemple illustre la manière dont on peut utiliser divers procédés de réticulation à la chaleur ou de réticulation chimique pour ajuster la vitesse de libération de l'épinéphrine bronchodilatateur des sphères microscopiques d'albumine. La
20 vitesse de libération du médicament des sphérules a été déterminée par la méthode décrite ci-dessus.

Echantillon A

Concentration initiale d'albumine dans l'eau : 50 %
(poids/volume). Composition des sphérules : 3,1 % d'acide
25 L(+)-ascorbique, 88,1 % de sérum-albumine humaine (HSA),
8,8 % d'épinéphrine (base libre). Conditions de réticulation :
115°C dans un bain d'huile de graines de cotonnier pendant une
heure.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

<u>Temps (minutes)</u>		<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
	0	0	100
5	3	4,3	95,7
	6	11,0	89,0
	9	23,4	76,6
	12	34,6	65,4
10	15	38,1	61,9
	18	51,5	48,5
	21	56,7	43,3
	24	60,8	39,2
	27	65,5	34,5
	30	68,6	31,4
15	36	74,5	25,5
	42	78,5	21,5
	48	81,4	18,6
	63	86,4	13,6
20	78	89,3	10,7
	208	94,7	5,3

Echantillon B

Concentration initiale en albumine : 50 % en poids/volume.

Composition des sphérules : 87,5 % de HSA, 8,9 % d'épinéphrine,

25 3,6 % d'acide L(+)ascorbique. Conditions de réticulation : 120°C dans un bain d'huile de graines de cotonnier pendant 6 heures.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

<u>Temps (minutes)</u>		<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
30	0	0	100
	3	7,5	92,5
	6	17,1	82,9
	9	25,5	74,5
	12	34,3	65,7
35	15	41,3	58,7
	18	47,4	52,6
	21	52,2	47,8
	27	59,1	40,9
	33	64,2	35,8
	42	69,2	30,8
40	57	73,6	26,4
	72	76,0	24,0
	102	78,9	21,1
	154	81,6	18,4

Echantillon C

Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume).
Composition des sphérules : 86,9 % de HSA, 8,7 % d'épinéphrine,
4,4 % d'acide L(+)ascorbique.

- 5 Conditions de réticulation : 130°C dans un bain d'huile
de graines de cotonnier pendant 6 heures.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

	<u>Temps (minutes)</u>	<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
	0	0	100
10	3	7,8	92,2
	6	18,0	82,0
	9	26,2	73,8
	12	33,2	66,8
	15	38,4	61,6
15	18	42,1	57,9
	21	45,8	54,2
	27	51,2	48,8
	33	56,2	43,8
	48	63,5	36,5
20	66	70,8	29,2

Echantillon D

Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume).
Composition des sphérules : 87,5 % de HSA, 8,8 % d'épinéphrine,
3,5 % de L(+)acide ascorbique.

- 25 Conditions de réticulation : 145°C dans un bain d'huile
de graines de cotonnier pendant 6 heures.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

	<u>Temps (minutes)</u>	<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
	0	0	100
30	4	2,4	97,6
	7	6,1	93,9
	10	10,2	89,8
	13	13,9	86,1
35	16	16,4	83,6
	22	20,8	79,2
	34	25,0	75,0
	44	30,7	69,3

Echantillon E

- 40 Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume).
Composition des sphérules : 87,8 % de HSA, 8,9 % d'épinéphrine,
3,3 % d'acide L(+)ascorbique. Conditions de réticulation :
165°C dans l'huile de graines de cotonnier pendant 6 heures.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

	<u>Temps (minutes)</u>	<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
	0	0	100
5	3	1,0	99,0
	6	2,3	97,7
	9	4,0	96,0
	12	5,2	94,8
10	15	6,3	93,7
	18	7,6	92,4
	21	8,2	91,8
	27	9,5	90,5
	48	12,4	87,6
	78	14,8	85,2
15	158	17,7	82,3

Echantillon F

Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume).

Composition des sphérules : 81,8 % de HSA, 12,3 % d'épinéphrine, 5,9 % d'acide L(+)ascorbique. Conditions de réticulation :

20 4 heures dans 500 ml d'huile de graine de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol + 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 %.

CARACTERISTIQUES DE LIBERATION

	<u>Temps (minutes)</u>	<u>Pourcentage de médicament libéré</u>	<u>Pourcentage de médicament retenu</u>
25	0	0	100
	5	2,6	97,4
	8	6,5	93,5
	11	11,2	88,8
30	14	13,6	86,4
	17	16,0	84,0
	20	18,0	82,0
	23	19,3	80,7
	26	21,0	79,0
	44	26,7	73,3
35	59	29,3	70,7
	74	30,1	69,9
	176	32,8	67,2

Comme le montrent les échantillons A à E, l'augmentation de la durée et de la température de réticulation à chaud réduit à la fois la vitesse à laquelle l'épinéphrine est libérée des sphérules d'albumine et la quantité totale de médicament libérée des sphérules par simple diffusion. Le reste du médicament emprisonné dans chaque sphérule est vraisemblablement libéré par dégradation de la sphérule dans l'organisme. L'échantillon A (115°C, 1 heure), par exemple, libère à peu près 50 % du médicament emprisonné en une heure, tandis que l'échantillon E plus fortement réticulé (165°C, 6 heures), libère moins de 20 % du médicament emprisonné en trois heures. Ces échantillons illustrent donc la manière dont le choix de la durée et de la température de réticulation permet d'obtenir des sphérules qui libèrent le médicament emprisonné à une vitesse et en une quantité prédéterminées.

Il y a lieu de remarquer également que dans l'échantillon F, un traitement de réticulation au glutaraldéhyde d'une durée de quatre heures équivaut à peu près à six heures de traitement à la chaleur à 140-150°C.

Les données de libération obtenues avec les échantillons A à F ont été soumises à une analyse mathématique, afin de déterminer la constante de vitesse (K) et la période ($t_{1/2}$) de libération du médicament.

Si l'on suppose que la vitesse de libération du médicament des sphérules est du premier degré, et par conséquent proportionnelle à la concentration de médicament restant dans les sphérules, la constante de vitesse peut être déterminée d'après l'équation :

$$\frac{-dc}{dt} = Kc$$

dans laquelle :

c est la concentration du médicament restant dans les sphères au temps t ;

K est la constante de vitesse de libération du médicament ;

t est le temps ;

c_0 est la concentration initiale du médicament au temps $t = 0$.

On peut tirer de cette équation l'équation finale de détermination de la constante K de libération du premier ordre en procédant comme suit :

5 (1) $-\frac{dc}{c} = Kdt$

$$(2) \int_{c_0}^c \frac{dc}{c} = - \int_0^t Kdt$$

(3) $\ln c - \ln c_0 = -Kt$

10 (4) $\ln(c/c_0) = -Kt$

ou

$$c = c_0 e^{-Kt}$$

On multiplie les deux membres de l'équation par 100 pour transformer la fraction (c/c_0) de médicament restant en 15 pourcentage de médicament restant $(100 c/c_0)$.

$$(5) \frac{100c}{c_0} = 100e^{-Kt}$$

En prenant le logarithme naturel des deux membres de l'équation, on a :

20 (6) $\ln (100c/c_0) = \ln (\% \text{ de médicament restant dans la sphérule}) = -Kt + \ln 100 = -Kt + B \text{ (constante)}$

$$(7) \ln (100c/c_0) = -Kt + B$$

Si le système médicament-sphérule obéit au comporte-

ment de libération du premier degré, la courbe de variation de $\ln(c/c_0)$ ou $\ln(100c/c_0)$ en fonction du temps doit être linéaire, avec pour pente $-K$. Pour $c = 0,5 c_0$ on a :

$$\ln(c/c_0) = \ln(0,5c_0/c_0) = 0,5 = -Kt_{1/2}$$

5 où $t_{1/2}$ = période de libération = $\frac{-\ln 0,5}{K} = \frac{0,693}{K}$

Par conséquent, il est possible de déterminer la constante de vitesse de libération K et la période $t_{1/2}$ d'après des graphiques convenables de variation du logarithme de la fraction de médicament restant en fonction du temps.

- 10 En traçant la courbe de variation des valeurs de libération obtenues pour les échantillons A à F, on a constaté que la période initiale (30 à 50 minutes) de chaque courbe de libération est tout à fait linéaire et peut être représentée par l'équation $\ln(c/c_0) = -Kt$ (fraction de médicament retenue
- 15 par la sphérule) ou par l'équation $\ln(100c/c_0) = -Kt + B$ (pourcentage de médicament retenu par la sphérule).

- De même, lorsqu'on dispose de renseignements suffisants, on peut représenter les dernières portions de ces courbes de libération par une autre droite de pente différente. Les
- 20 courbes de variation de $\ln(c/c_0)$ ou de $\ln(100c/c_0)$ en fonction du temps s'infléchissent dans la portion centrale en indiquant un changement des propriétés de libération passant d'une grande vitesse à une vitesse faible à mesure que la libération du médicament progresse.

- 25 Les données de libération obtenues pour les échantillons A à F ont toutes été analysées conformément à l'équation (7) ci-dessus en utilisant la méthode des moindres carrés et les droites "optimales" passant par les portions initiales et les portions finales des courbes déterminées. Les valeurs de
- 30 K et de $t_{1/2}$ ont été déterminées de même pour les portions initiales et les portions finales de chaque courbe de libération. Les paramètres B optimaux, les valeurs de K et les valeurs de $t_{1/2}$ pour les échantillons A à F sont récapitulées sur le tableau suivant :

Echan- tillon	K (initial)	t1/2 (initial)	B(initial)	K (final)	t1/2 (final)	B (final)
A	$37,94 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	18,3 min	4,63	$6,07 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	114,2 min	2,92
B	$32,67 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	21,2 min	4,59	$3,18 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	217,9 min	3,39
C	$25,37 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	27,3 min	4,55	Données insuf- fisantes	Données insuf- fisantes	--
D	$9,09 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	76,2 min	4,60	Données insuf- fisantes	Données insuf- fisantes	--
E	$3,92 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	176,7 min	4,60	$0,55 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	1271,6 min	4,49
F	$9,70 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	71,4 min	4,61	$0,41 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	1686,1 min	4,28

Exemple 3

On a préparé des sphères microscopiques de sérum-albumine renfermant le médicament antitumoral appelé 5-fluorouracile (5-FU) et on a déterminé la libération du médicament des sphérules, conformément à la méthode de l'exemple 2. Les résultats sont reproduits sur les tableaux suivants.

Echantillon A

Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume) ;

Composition des sphères : 90,9 % de HSA, 9,1 % de 5-FU ;

Conditions de réticulation : une heure dans l'huile de graine de cotonnier à 100°C.

Caractéristiques de libération in vitro

15 Temps (minutes)	Pourcentage de médicament libéré	Pourcentage de médicament retenu
0	0	100
1	4,4	95,6
20 4	23,2	76,8
7	42,7	57,3
10	54,7	45,3
13	63,4	36,6
16	70,1	29,9
25 19	75,9	24,1
25	83,4	16,6
31	88,3	11,7

Echantillon B

Concentration initiale en albumine : 50 % en (poids/volume) ;

Composition des sphères : 90,4 % de HSA, 9,6 % de 5-FU ;

Conditions de réticulation : une heure dans l'huile de graines de cotonnier à 140°C.

Caractéristiques de libération

	Temps (minutes)	Pourcentage de médicament libéré	Pourcentage de médicament retenu
5	0	0	100
	2	2,3	97,7
	5	9,0	91,0
	8	15,0	84,5
	11	20,0	80,0
10	14	22,5	77,5
	17	24,2	75,8
	20	25,5	74,5
	100	31,4	68,6

Exemple 4

- 15 Cet exemple illustre les caractéristiques de libération du médicament antitumoral appelé 6-mercaptopurine (6-MP) de sphérules de sérum-albumine humaine, comme déterminé par la méthode de l'exemple 2.

Concentration initiale en albumine : 50 % (poids/volume)

- 20 Composition des sphères : 83,4 % de HSA, 16,6 % de 6-MP

Conditions de réticulation : une heure dans l'huile de graine de cotonnier à 140°C.

Caractéristiques de libération

	Temps (minutes)	Pourcentage de médicament libéré	Pourcentage de médicament retenu
25	0	0	100
	4	2,1	97,9
	7	5,8	94,2
	10	9,6	90,4
30	13	12,3	87,7
	16	14,8	85,2
	19	16,7	83,3
	25	20,3	79,7
	40	26,6	73,4
35	55	31,4	68,6
	70	34,8	65,2
	100	39,5	60,5
	130	41,6	58,4
40	148	44,4	55,6

Exemple 5

Cet exemple illustre les caractéristiques de libération du médicament antitumoral appelé 6-thioguanine de sphérules de sérum-albumine humaine, déterminées d'après la méthode de l'exemple 2.

Concentration initiale en albumine : 50 % en poids/volume

Composition des sphères : 82,2 % de HSA, 17,8 % de 6-thioguanine ;

Conditions de réticulation : Une heure dans l'huile de graine de cotonnier à 123°C.

Caractéristiques de libération

	Temps (minutes)	Pourcentage de médicament libéré	Pourcentage de médicament retenu
15	0	0	100
	7	1,2	98,8
	10	2,3	97,7
	13	3,3	96,7
	16	4,6	95,4
20	19	6,5	93,5
	22	7,7	92,3
	25	9,1	90,9
	28	10,4	89,6
	34	13,0	87,0
25	40	15,2	84,8
	55	20,3	79,7
	85	29,7	70,3
	115	37,7	62,3
	145	43,0	57,0
30	175	47,9	52,1
	412	55,0	45,0

Exemple 6Agents antitumoraux

Une analyse cinétique du premier degré des résultats obtenus dans les exemples 3-5 pour la libération du médicament a été effectuée conformément à la méthode décrite dans l'exemple 2. Les paramètres de vitesse obtenus sont récapitulés sur le tableau suivant :

Exemple	K(initial)	t _{1/2} (initial)	B (initial)	K (final)	t _{1/2} (final)	B (final)
3A (100°C, 1 h)	$76,64 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	9,0 min	4,61	$60,17 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	11,5 min	4,32
3B (140°C, 1 h)	$19,51 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	35,5 min	4,61	$1,13 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	615 min	4,34
4 (140°C, 1 h)	$9,66 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	71,7 min	4,61	$2,13 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	325 min	4,33
5 (123°C, 1 h)	$4,27 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	162,3 min	4,62	$0,78 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$	886 min	4,13

Lorsqu'on compare les valeurs K et $t_{1/2}$ des exemples 3A et 3B, on constate que les sphérules d'albumine contenant le 5-FU qui ont été chauffées à 100°C pendant une heure ont un très faible caractère biphasé, tandis que l'échantillon de 5-FU réticulé à 140°C pendant une heure a un caractère biphasé accentué. Les valeurs $t_{1/2}$ (initiale) et $t_{1/2}$ (finale) présentent un fort accroissement lorsque la température de réticulation s'élève.

La 6-MP et la 6-thioguanine retenues dans les sphérules d'albumine ont des caractéristiques de libération biphasée comme l'indiquent les exemples 4 et 5. Les valeurs $t_{1/2}$ (initiale) et $t_{1/2}$ (finale) pour 6-MP croissent plus vite que les valeurs correspondantes pour la 6-thioguanine, bien que la 6-MP soit chauffée à 140°C au lieu de 123°C pour la 6-thioguanine. Le fait que les valeurs $t_{1/2}$ sont plus longues pour la 6-thioguanine est sans aucun doute le reflet de la plus faible solubilité dans l'eau de ce composé, comparativement à la 6-MP.

Les exemples suivants montrent que les procédés utilisés pour préparer les sphérules de l'invention ne détruisent pas l'activité du médicament emprisonné.

Exemple 7

On disperse environ 20-25 mg de sphérules de sérum-albumine humaine préparées à partir de solutions à 50 % de HSA contenant l'épinéphrine comme médicament bronchodilatateur dans 10 ml d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique (pH 3,0) et on les agite à l'aide d'un agitateur magnétique pendant une heure pour libérer des quantités appréciables de médicament emprisonné. On centrifuge les sphérules et on les sépare de la liqueur surnageante que l'on soumet à une analyse spectrophotométrique pour déterminer la concentration du médicament libéré. Ces échantillons de liqueur surnageante sont ensuite soumis à une évaluation d'efficacité in vitro d'après le test suivant portant sur le tissu trachéen du cobaye.

On met en suspension du tissu trachéen de cobaye dans la solution de Krebs à 38°C et on laisse la suspension s'équilibrer. On relie le tissu à un extensomètre et à un enregistreur, de manière à pouvoir mesurer les variations de longueur

- du tissu dues à sa contraction ou à sa relaxation. L'addition de petites quantités d'un agoniste tel que l'histamine (environ 2 µg/ml) entraîne une forte contraction du tissu. L'addition d'épinéphrine pure ou des solutions surnageantes contenant de
- 5 l'épinéphrine provenant des sphérules d'albumine entraîne la relaxation du tissu. La concentration de l'épinéphrine libérée (en µg/ml) nécessaire pour provoquer la relaxation du tissu trachéen contracté par l'histamine est déterminée et comparée avec un témoin à l'épinéphrine évalué de façon similaire,
- 10 pour estimer l'activité de l'épinéphrine libérée.

Les résultats obtenus dans les tests portant sur le tissu trachéen du cobaye sont reproduits sur le tableau suivant :

15	Composition de l'échantillon de sphères d'où provient le médicament	Dose de médicament ajouté au bain de tissu trachéen (µg/ml)	Pourcentage de relaxation du tissu trachéen
	A 1-épinéphrine pure (témoin)	0,1-0,2	100
20	B HSA = 78 %, épi = 12,5 %, acide L(+)-ascorbique = 9,5 % Conditions de réticulation : 68°C, 2,5 heures	0,1	100
25	C HSA = 73,8 %, épi = 21,2 %, Acide L(+)-ascorbique = 5,0 % Conditions de réticulation: 100°C, 1 heure	0,1	100
30	D HSA = 86,9 %, épi = 8,7 %, acide L(+)-ascorbique = 4,4 % Conditions de réticulation: 100°C, 6 heures	0,01 0,02 0,03	25 75 100
35	E HSA = 87,3 %, épi = 8,8 % Acide L(+)-ascorbique = 3,9 % Conditions de réticulation: 110°C, 1 heure	0,01 0,02 0,03 0,05 0,10	27 53 73 82 100
40	F HSA = 87,7 %, épi = 8,8 %, Acide L(+)-ascorbique = 3,5 % Conditions de réticulation: 110°C, 4 heures	0,01 0,02 0,03 0,05 0,10	6 31 53 71 100

(suite)

	Composition de l'échantillon de sphères d'où provient le médicament	Dose de médica- mont ajouté au bain de tissu trachéen ($\mu\text{g/ml}$)	Pourcentage de relaxation du tissu trachéen
5	G HSA = 88,1 %, épi = 8,8 %, Acide L(+)ascorbique = 3,1 %, conditions de ré- ticulation : 115°C, 1 heu- re	0,01 0,02 0,03 0,05 0,10	32 72 84 91 100
10	H HSA = 87,5 %, épi = 8,8 %, Acide L(+)ascorbique = 3,7 %, Conditions de réticulation: 120°C, 6 heures	0,01 0,02 0,03 0,05	25 75 92 100
15	I HSA = 86,9 %, épi = 8,7 %, Acide L(+)ascorbique = 4,4 %, Conditions de réticulation: 130°C, 6 heures	0,01 0,02 0,03 0,04 0,10 0,20	0 7 22 37 67 100
20	J HSA = 87,5 %, épi = 8,8 %, Acide L(+)ascorbique = 3,7 %, Conditions de réticulation: 145°C, 6 heures	0,01 0,03 0,04 0,05 0,10 0,20 0,30 0,40	0 7 11 19 33 67 89 100
30	K HSA = 87,8 %, épi = 8,9 %, Acide L(+)ascorbique = 3,3 %, Conditions de réticulation: 165°C, 6 heures	0,01 0,04 0,10 0,20 0,30 0,40 0,50	0 10 30 50 60 80 100
35	L HSA = 80,8 %, épi = 12,3 %, Acide L(+)ascorbique = 5,9 %, Conditions de réticulation: 4 heures dans 500 ml d'huile de graine de cotonnier con- tenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 % ; 25°C.	0,1	100

(Suite)

Composition de l'échantillon de sphères d'où provient le médicament	Dose de médicament ajouté au bain de tissu trachéen ($\mu\text{g/ml}$)	Pourcentage de relaxation du tissu trachéen
5 M HSA = 67,3 %, épi = 20,2 %, Acide L(+)ascorbique = 12,5 % Conditions de réticulation : 4 heures dans 500 ml d'huile de graine de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de formaldéhyde à 37 % ; 25°C.	1,4 2,8	0 0
15 Comme on peut le voir pour les échantillons A à K ci-dessus, il y a une certaine baisse de l'activité de l'épinéphrine à mesure que les températures de réticulation augmentent. Aucune perte sensible d'activité (par comparaison avec le témoin à l'épinéphrine pure) n'apparaît tant que la température de réticulation ne dépasse pas 130°C. Toutefois, on 20 est surpris de constater que même après réticulation des sphérules à 165°C pendant 6 heures, il reste une activité notable d'épinéphrine. Ainsi, même des sphères microscopiques réticulées à haute température sont efficaces et conviennent pour l'injection 25 parentérale à des êtres humains.		
30 L'épinéphrine emprisonnée dans des sphérules de HSA réticulées avec du glutaraldéhyde garde son activité essentiellement totale. Dans l'exemple 2, on constate que la réticulation au glutaraldéhyde pendant quatre heures équivaut à peu près à une réticulation à la chaleur pendant six heures à 140-150°C. Attendu qu'il ne semble n'y avoir qu'une perte d'activité faible ou même nulle associée avec la réticulation au glutaraldéhyde (comparativement à la légère baisse d'activité dans le cas de la réticulation par la chaleur à 140-150°C), 35 la technique de réticulation chimique pourrait être préférable pour l'épinéphrine si l'on désirait obtenir des sphères plus étroitement réticulées.		

Le formaldéhyde n'est pas l'agent de réticulation de choix pour des sphérules contenant de l'épinéphrine.

Exemple 8

On répète le mode opératoire de l'exemple 7, en utilisant des sphérules de sérum-albumine humaine contenant le bronchodilatateur appelé salbutamol. Les résultats sont re-

5 produits sur le tableau suivant :

<u>Microsphères de HSA contenant du salbutamol</u>			
	<u>Composition de l'échantillon de sphérules</u>	<u>Dose (µg/ml)</u>	<u>Relaxation, %</u>
10	A Salbutamol (témoin)	0,1	100
	B HSA = 88,5 %, salbutamol = 6,3 %	0,1	100
	Acide L(+) ascorbique = 4,6 %		
15	Conditions de réticulation : 115°C, 1 heure		
	C HSA=86,1 %, salbutamol = 7,9 %	1,0	100
	Acide L(+) ascorbique = 6,0 %		
20	Conditions de réticulation : 4 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 % : 25°C		
25			

Tandis que la réticulation par la chaleur à 115°C pendant 1 heure ne semble pas affecter l'activité du salbutamol, la réticulation au glutaraldéhyde semble abaisser l'activité du médicament.

30

Exemple 9

On répète le mode opératoire de l'exemple 7, en utilisant des sphérules de sérum-albumine humaine contenant le bronchodilatateur appelé terbutaline. Les résultats sont re-

35 produits sur le tableau suivant :

	<u>Composition de l'échan-</u> <u>tillon de sphérules</u>	<u>Dose</u> <u>(μg/ml)</u>	<u>Relaxation,</u> <u>%</u>
	A Terbutaline pure (témoin)	0,1-1,0	100
5	B HSA = 78,7 % terbutaline = 11,7 % Acide L(+)ascorbique = 9,6 % Conditions de réticula- tion : 68°C, 2,5 heures	0,1-1,0	100
10			
	C HSA = 82,9 % Terbutaline = 12,5 % Acide L(+)ascorbique = 4,6 % Conditions de réticula- tion : 105°C; 1 heure	0,1-1,0	100
15			
	D HSA = 81,5 % Terbutaline = 12,3 % Acide L(+)ascorbique = 6,2 % Conditions de réticula- tion : 4 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 % ; 25°C	0,1-1,0	100
20			
25			

30 Il ressort de ce qui précède que ni l'un ni l'autre des procédés de réticulation par voie thermique ou par voie chimique utilisés n'a exercé d'effet nuisible sur l'activité broncho-dilatatrice de la terbutaline.

Exemple 10

35 On a évalué l'activité de sphérules de sérum-albumine humaine contenant le médicament antitumoral appelé 5-fluoruracile par un test portant sur les cellules L de la souris.

Des fibroblastes embryonnaires de souris (L-676) sont cultivés et maintenus dans des cultures liquides sous agitation par secousses du milieu de Swims-67G renforcé par l'addition de 5 % de sérum de fœtus de veau et additionné de 1 % de glutamine 0,200 M.

Des médicaments libres (sans véhicule) utilisés comme témoins sont dissous dans de l'eau distillée ou de l'acétone

stérile puis ajoutés au milieu de croissance. Lorsque l'acétone est utilisée comme solvant du médicament, les taux de concentration sont toujours assez faibles pour rester non toxiques envers le milieu de croissance.

5 Des sphérules de HSA contenant un médicament sont remises en suspension dans le milieu de croissance. Un bain-marie à ultrasons est utilisé pour faciliter la mise en suspension. L'examen microscopique ne révèle aucune destruction des sphères.

10 On utilise un inoculum à 10 % en volume/volume de cellules L dans un volume final de 20 ml de milieu de croissance contenant en suspension des microsphères additionnées de médicament ou bien le médicament témoin libre. On évalue les résultats par un comptage direct des cellules après incubation
15 sur une secoueuse rotative (200 tr/min) à 37°C pendant 3 jours et on les exprime par le pourcentage d'inhibition de la croissance par rapport aux cultures cellulaires témoins (non traitées). Tous les tests ont été effectués en double.
Pourcentage d'inhibition de la croissance des cellules L au bout
20 de 72 heures

		Concentration du médicament dans la suspension de cellules L ($\mu\text{g/ml}$)			
<u>Agent antitumoral</u>		<u>1</u>	<u>10</u>	<u>50</u>	<u>100</u>
25	Témoin de 5-fluoruracile (5-FU) pur (non contenu dans des sphères)	67 %	88 %	93 %	93 %
<u>5-FU dans diverses sphérules d'albumine réticulées</u>					
30		Concentration en médicament dans les sphères (μg de 5-FU/ml de culture de cellules)		Inhibition des cellules L, %	
35	<u>Echantillon A</u>				
	Composition des sphères : 99 % de HSA, 1 % de 5-Fu	0,3		39	
	Conditions de réticulation : 24 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de formaldéhyde à 37 %, à 25°C	3,0		99	
40					

		Concentration en médicament dans les sphères (µg de 5-FU/ml de culture de cellules)	Inhibition des cel- lules L, %
5	<u>Echantillon B</u>		
	Composition des sphères : 86,6 % de HSA		
10	13,4 % de 5-FU	4,0	98
	Conditions de réticulation : 24 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant		
15	13 ml de n-butanol et 2,0 ml de formaldéhyde à 37 %, à 25°C		
	<u>Echantillon C</u>		
	Composition des sphères : 98,7 % de HSA		
20	1,3 % de 5-FU	0,4	47
	Conditions de réticulation : 140°C dans un bain d'huile de graines de cotonnier pendant 2 heures	3,9	95
25	<u>Echantillon D</u>		
	Composition des sphères : 86,9 % de HSA,		
	13,1 % de 5-FU	3,9	99
30	(plus forte concentration que dans l'échantillon C) Conditions de réticulation : 140°C au bain d'huile de graines de cotonnier pendant 2 heures		
35	<u>Echantillon E</u>		
	Composition des sphères : 83,1 % de HSA		
	16,9 % de 5-FU	5,1	100
40	Conditions de réticulation : 5,5 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de formaldéhyde à 37 %, à 25°C		
45	Ces résultats démontrent que des sphérules d'albumine réticulées tant à la chaleur que par voie chimique et contenant du 5-FU gardent une forte activité après l'étape d'incorporation du médicament.		

Exemples 11-17

En suivant le mode opératoire décrit dans l'exemple 10, on soumet des sphérules d'albumine contenant d'autres médicaments antitumoraux à des tests de détermination de l'activité retenue, comparativement à des médicaments antitumoraux libres. Les résultats sont reproduits sur le tableau suivant :

N° de l'exemple	Composition des sphérules	Concentration du médicament dans les sphérules (μg des médicaments/ml de culture cellulaire)	Pourcentage d'inhibition des cellules L
10			
11	a) 95,5 % de HSA	1,35	28
15	Chlorambucile	13,5	89
20	4,5 % de chlorambucile Conditions de réticulation : 24 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de formaldéhyde à 37 %		
25	b) Chlorambucile libre (témoin)	1 10 50	0 68 97
12	a) 83,9 % de HSA	4,8	88
30	Acétate d'hydrocortisone		
35	16,1 % d'acétate d'hydrocortisone Conditions de réticulation : 120°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier		
40	b) Acétate d'hydrocortisone libre (témoin)	1,0 10,0 50,0 100,0	0 0 73 88
13	a) 83,1 % de HSA	5,1	99
40	Colchicine		
45	16,9 % de colchicine Conditions de réticulation : 143°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier		
50	b) 83,4 % de HSA	5,0	93
	16,6 % de colchicine Conditions de réticulation : 5,5 heures dans 500 ml d'huile de graines de cotonnier contenant 13 ml de n-butanol et 2,0 ml de glutaraldéhyde à 25 %		
	c) Colchicine libre (témoin)	1,0 10,0	91 99

N° de l'exemple	Composition des sphérules	Concentration	Pourcen-
		du médicament dans les sphérules (μg des médicaments/ml de culture cellulaire)	tage d'inhibition des cellules L
5			
10	14 hydroxyurée a) 86,4 % de HSA 16,6 % d'hydroxyurée Conditions de réticulation : 125°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier	5,0	25
15	b) Hydroxyurée libre (témoin)	1,0 10,0	0 22
20	15 6-thioguanine a) 82,2 % de HSA 17,8 % de 6-thioguanine Conditions de réticulation : 123°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier	5,3	96
	b) 6-thioguanine libre (témoin)	1,0 10,0 50,0	65 88 92
25	16 Busulfane a) 83,2 % de HSA 16,8 % de busulfane Conditions de réticulation : 115°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier	25,0	56
30	b) Busulfane libre (témoin)	25,0	69
35	17 6-mercaptopurine a) 83,0 % de HSA 17,0 % de 6-mercaptopurine Conditions de réticulation : 130°C, 1 heure dans l'huile de graines de cotonnier	50	95
	b) 6-mercaptopurine libre (témoin)	50	94

REVENDEICATIONS

1. Sphérules pleines en sérum-albumine pour l'injection parentérale in vivo, caractérisées par le fait qu'elles retiennent de façon homogène 2 à 70 % de leur poids d'un médicament organique non radio-actif qui est soluble dans l'eau, à 37°C, dans une proportion d'au moins 0,01 %, ces sphérules ayant été chauffées à 110-180°C pendant au moins 20 minutes au cours de leur préparation pour réticuler l'albumine, ou réticulées de manière équivalente par exposition à un ou plusieurs agents chimiques de réticulation, afin que le médicament soit libéré desdites sphérules selon un processus à deux phases.

2. Sphérules suivant la revendication 1, caractérisées par le fait que le médicament est un agent antitumoral choisi entre la 6-mercaptopurine, le 6-fluoruracile, la 6-thioguanine, l'hydroxyurée, la colchicine, le chlorambucile et le busulfane.

3. Sphérules suivant la revendication 1, caractérisées par le fait que le médicament est un bronchodilatateur choisi entre l'épinéphrine, le salbutamol et la terbutaline.

4. Sphérules suivant la revendication 1, caractérisées par le fait qu'elles sont dispersées dans un milieu diluant acceptable du point de vue pharmaceutique qui convient pour l'injection intravasculaire.

5. Composition thérapeutique destinée au traitement d'une maladie chez un animal par injection intravasculaire, caractérisée par le fait qu'elle est formée de sphérules en dispersion suivant la revendication 4.

6. Procédé de préparation de sphérules pleines formées de sérum-albumine, par injection d'une solution aqueuse de ladite albumine dans un bain d'huile végétale sous agitation, caractérisé par le fait que la solution d'albumine renferme un médicament dispersé et que le bain d'huile contient un alcool lipophile déshydratant et du glutaraldéhyde ou du formaldéhyde.

END